

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07237

研究課題名（和文）新規DPP8阻害剤による血液悪性腫瘍の治療開発とバイオマーカーの同定

研究課題名（英文）Development of the treatment for hematologic malignancies using a novel DPP8 inhibitor and identification of biomarkers

研究代表者

佐藤 勉（Sato, Tsutomu）

富山大学・学術研究部医学系・教授

研究者番号：40404602

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：これまでの研究で我々は、DPP8とDPP9の両者を阻害する1G244が血液悪性腫瘍に対する抗がん剤活性を有すること、およびその活性はDPP8の阻害を介するカスパーゼ3の活性化が担うことを明らかにした。その後、1G244から構造展開してDPP8に特異性を高めた12mが、より優れた抗がん剤活性を有することをin vitroで明らかにした。また、12m高感受性の細胞株はHckを高発現することを見出した。本研究では、12mの毒性と抗がん剤活性をin vivoで検討する。また、HckがDPP8を介するアポトーシスシグナルに関与するの、そして治療効果を予測するバイオマーカーになるのか検証する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の第1の目的は、新規DPP8阻害剤を用いた血液悪性腫瘍の治療開発である。副作用が少なく抗がん剤活性の強い新たな分子標的の低分子化合物は常に待ち望まれている。DPP8阻害剤は患者の予後改善に大きく寄与する可能性がある。またそれによって大きな恩恵が患者へもたらされるため、社会的な波及効果は大きい。さらに本研究の第2の目的は、DPP8が関与する生命現象のシグナル解明である。DPP8の阻害がアポトーシスを誘導することは研究代表者らが報告したが、それがどのようなシグナルを経由するのかが明らかになっていない。また、これまでそのような着眼点で行われた研究は報告されていないため、学術的な波及効果は大きい。

研究成果の概要（英文）：In previous studies, we have shown that 1G244, which inhibits both DPP8 and DPP9, has anticancer activity against hematological malignancies, and that this activity is mediated by activation of caspase-3 through inhibition of DPP8. Subsequently, we demonstrated in vitro that 12m, which was structurally expanded from 1G244 to have increased specificity for DPP8, has superior anti-cancer activity. We also found that 12m highly sensitive cell lines express high levels of Hck. In this study, we will examine the toxicity and anticancer activity of 12m in vivo. We will also examine whether Hck is involved in DPP8-mediated apoptosis signaling and whether it is a biomarker to predict therapeutic efficacy.

研究分野：血液内科学

キーワード：DPP8 阻害剤 血液悪性腫瘍 バイオマーカー 治療開発

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Dipeptidyl peptidase (DPP) はタンパク質分解酵素であり、N 末端から 2 番目のアミノ酸がプロリンもしくはアラニンであるペプチドから、加水分解により N 末端 2 個のアミノ酸を取り除く。DPP のファミリーには DPP4 や DPP8、DPP9 などが属し、それぞれに基質特異性があるため、治療の標的として優れている。例えば DPP4 に対する特異的な阻害剤は糖尿病治療薬として既に広く使用されている。インクレチンは膵臓からのインスリン分泌を促進する消化管ホルモンであるが、DPP4 阻害剤は DPP4 によるインクレチンの切断・不活化を阻害することが作用機序である。一方、DPP8 と 9 は構造が近似しているため、それぞれを特異的に阻害する阻害剤は存在しない。これまでの検討で我々は、DPP8 と DPP9 の両者を阻害する 1G244 が血液悪性腫瘍細胞に対して優れた抗がん剤活性を有すること、その抗がん剤活性は DPP8 の阻害とカスパーゼ 3 の活性化を介したアポトーシス誘導であることを明らかにして特許を取得 (特許第 7292702 号) また論文発表した (Sato T, Sci Rep. 2019;9:18094)。1G244 の抗腫瘍効果はマウス実験でも明らかだったが、高用量では致死毒性も認められた。この副作用は、1G244 の DPP9 に対する阻害活性が原因だろうと推測している。なぜなら、DPP9 は全身の組織にあまねく発現し、DPP9 のノックアウトマウスは胎生致死となる一方、DPP8 の発現は血球系に特異的である。すなわち、DPP8 に特異性の高い阻害剤は副作用が少なく、抗がん剤活性の強い抗血液悪性腫瘍薬となりうる。

2. 研究の目的

(1) 12m の毒性と抗がん剤活性 (in vivo)

DPP8 に特異性の高い新規阻害剤の創出という目的に関して、我々は DPP8/9 阻害剤である 1G244 から各種の化合物を展開した既報に着目し (J Med Chem. 2011;5416:5737-) 本論文中で検討された 28 種類の化合物の中から 12m を選択した。そしてこれを新規 DPP8 阻害剤開発の出発点、いわゆるリード化合物とした。なぜなら、この 12m は DPP8 に対する親和性が DPP9 に比べて 10 倍高い特性を示したためである。この 12m を既報に従って合成し、血液悪性腫瘍細胞株 THP-1 細胞に添加したところ、1G244 を上回る抗がん剤活性が確認された。また、アポトーシス誘導を担うカスパーゼ 3 の活性化も増強していた。このような予備データを背景とし、本研究ではまず 12m の抗がん剤活性を in vivo で検討する。

(2) 12m 感受性規定因子としての Hck

DPP8 阻害剤が誘導するアポトーシスシグナルの解析として予備的な検討を行なったところ、12m に対する感受性には細胞株によって大きな差を認めたが、高感受性株と低感受性株における DPP8 の発現は同程度であった。すなわち、12m への感受性は DPP8 の下流に位置する何らかの分子によって規定されると考えられた。そこで、12m 高感受性の細胞株 3 種と低感受性の細胞株 3 種を対象として、mRNA の発現を DNA チップで比較したところ、高感受性細胞株では 12 種類の mRNA が発現亢進していた。これら感受性規定因子の候補の中で血球系に特徴的なのは、Src family に属する tyrosine kinase のひとつである Hematopoietic cell kinase (Hck) であった。血球系に発現する Src family には、Hck の他に Lck、Lyn、Fyn、Blk そして Fgr などが知られているが、興味深いことに Lck の発現は感受性の高低に関与していなかった。このような予備データを背景とし、本研究ではまず対象とする細胞株を増やし、Hck を含めた Src family の発現と 12m 感受性との関連を検討する。

3. 研究の方法

(1) 12m の毒性と抗がん剤活性

毒性の検討では、マウスに 12m と 1G244 を 1 回皮下投与する。投与量は 1、10、30、60、100 mg/kg とし、急性の致死毒性を呈さない最高濃度を決定する。なお、これまでの基礎検討において、1G244 では 30 mg/kg の投与が可能であることは明らかになっている。次に抗がん剤活性の検討では、血液悪性腫瘍細胞株 THP-1 や MM.1S を免疫不全マウスに皮下移植して、12m と 1G244 を週 1 回で皮下投与する。皮下腫瘍の直径を測定して抗がん剤活性を評価すると同時に、体重を定期的に測定、血液検査も行うことで毒性の評価を行う。本検討によって、DPP8 に特異性の高い阻害剤 12m は抗がん剤活性に優れ、毒性の少ない抗血液悪性腫瘍薬であることを明らかにする。

(2) 12m 感受性規定因子としての Hck

追加で検討する細胞株の選定には Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) のデータを用いる。すなわち CCLE から血液悪性腫瘍の細胞株に関するデータを抽出し、Hck 高発現の細胞株および低発現の細胞株をピックアップする。これらの細胞株に 12m を添加して感受性を検討すると同時に、ウエスタンブロットで Hck、Lck、Lyn、Fyn、Blk そして Fgr などの発現を検討する。次に、Hck を高発現する細胞株には Hck のノックダウンを、Hck を低発現する細胞株には Hck の強制発現を行なって、12m に対する感受性の変化を検討する。なお、ノックダウンには MISSION shRNA® (Sigma-Aldrich) のレンチウイルスを、強制発現には Applied Biological Materials のレンチウイルスライブラリーを用いる。本検討によって、Hck が DPP8 を介するア

ポトースシグナルに関与すること、そして治療効果を予測するバイオマーカーになることを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 12m の毒性と抗がん剤活性

in vivo の研究では、まず該当する阻害剤の毒性プロファイルを調べる実験を行った。1G244 または 12m の投与による急性毒性で被検動物が死亡することはなかった。しかしながら、1G244 では用量依存的な体重減少が観察された。一方、この体重減少毒性は、投与量を 150 mg/kg に増やしても、12m では観察されなかった。次の in vivo 実験では、阻害剤の抗腫瘍効果を調べた。感受性の細胞株 MM.1S 細胞を皮下移植したマウスに 1G244 または 12m を 30 mg/kg 投与すると腫瘍増殖が抑制されたが、12m は有意に優れた抗腫瘍活性を示した。一方、耐性細胞株 Daudi を移植したマウスに 30mg/kg の 12m を投与しても腫瘍増殖は抑制されなかった。しかし、12m の投与量を 150mg/kg に増やすと、Daudi 細胞の腫瘍は有意に縮小した。これらの結果から、12m はオリジナルの 1G244 と比較して優れた抗腫瘍活性を有し、体重減少の副作用を伴わずに高用量で耐性細胞に対して有効性を示すことが示された。

(2) 12m 感受性規定因子としての Hck

最初の研究では、ウェスタンブロット法を用いて各細胞株における HCK タンパク質レベルを調べた。検討した感受性細胞株は THP-1、MM.1S、KARPAS299 であり、検討した耐性細胞株は KG1、NAMALWA、Daudi であった。HCK は 3 つの高感受性細胞株で選択的に高発現していた。対照的に、LCK、Fyn、c-Fgr、Lyn、Blk など、造血細胞での発現が知られている Src ファミリーチロシンキナーゼの他のメンバーの感受性と発現との関連は見られなかった。さらに、MOLM-13、NOMO-1、および SKM-1 は 1G244 に感受性であったが、Jurkat、K562、RPMI8226、および Raji は 1G244 に耐性であった。HCK は 3 つの感受性細胞株で選択的に高発現していた。DPP8/9 阻害剤感受性における HCK 依存性をさらに確認するため、高感受性 MM.1S 細胞で HCK ノックダウン試験を行った。ノックダウンした細胞は、100 μ M の 1G244 に対する感受性には影響が見られなかった。これらの結果から、DPP8 を介したアポトーシスには HCK は関与していないことが示された。さらに、低感受性 Daudi および NAMALWA において HCK を強制発現させても、1G244 に対する感受性は変化しなかった。これらの結果から、HCK の存在は DPP8/9 阻害剤の抗腫瘍効果にとって必要条件ではあるが、十分条件ではないことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kikuchi Shohei, Wada Akinori, Kamihara Yusuke, et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 DPP8 Selective Inhibitor Tominostat as a Novel and Broad-Spectrum Anticancer Agent against Hematological Malignancies	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1100 ~ 1100
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells12071100	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 佐藤勉	4. 巻 38
2. 論文標題 新規 DPP8 阻害剤による血液悪性腫瘍の治療開発とバイオマーカーの同定	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bio Clinica	6. 最初と最後の頁 600-602
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 佐藤勉	4. 巻 39
2. 論文標題 抗血液悪性腫瘍薬としての新規DPP8阻害剤開発	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Bio Clinica	6. 最初と最後の頁 518-519
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 DPP8選択的阻害剤	発明者 佐藤勉	権利者 富山大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-059812	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	和田 暁法 (Wada Akinori) (60775922)	富山大学・学術研究部医学系・講師 (13201)	
研究分担者	菊地 尚平 (Kikuchi Shohei) (80515792)	富山大学・学術研究部医学系・特命助教 (13201)	
研究分担者	神原 悠輔 (Kamihara Yusuke) (10624421)	富山大学・学術研究部医学系・助教 (13201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関